

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 348 445 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
01.10.2003 Patentblatt 2003/40

(51) Int Cl.7: **A61L 2/00**

(21) Anmeldenummer: **03003632.1**

(22) Anmeldetag: **18.02.2003**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HU IE IT LI LU MC NL PT SE SI SK TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO

(71) Anmelder: **Aventis Behring GmbH**
35002 Marburg (DE)

(72) Erfinder:
• **Lengsfeld, Thomas**
35041 Marburg (DE)
• **Schnelder, Heinrich**
35094 Lahntal (DE)

(30) Priorität: **15.03.2002 DE 10211632**

(54) Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Proteinlösung durch Nanofiltration

(57) Es wird ein Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Proteinlösung durch Nanofiltration beschrieben, bei dem man die Proteinlösung vor der Nanofiltration zur Verminderung oder Verhinderung der Aggregation der Proteinmoleküle mit einer chaotropen Substanz aus der Gruppe bestehend aus Arginin, Guanidin, Ci-

trullin, Harnstoff oder ihren Derivaten oder mit einer Verbindung aus der Gruppe der Polyethoxysorbitanester versetzt und anschließend die Lösung durch ein Filter mit einer Porengröße zwischen 15 bis 25 nm gibt.

EP1 348 445A1

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist die Nanofiltration von Proteinlösungen, mit der es gelingt, Viren praktisch vollständig abzutrennen.

[0002] Für kleine Proteinmoleküle ist die Nanofiltration ein sehr wirksames Verfahren zur Entfernung von Viren. Dabei muss die Porengröße des Filters kleiner als der effektive Durchmesser des zu entfernenden Virus sein. Außerdem sind die Temperatur, die Stoffeigenschaften und die Pufferbedingungen von entscheidender Bedeutung bei der Durchführung einer Nanofiltration. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass der Parvovirus durch Filter mit einem Porendurchmesser von 15 nm zuverlässig entfernt werden kann. Die Nanofiltration ist auch schon zur Abtrennung des Hepatitis-A-Virus und des Parvovirus aus Faktor IX-Präparaten eingesetzt worden, wobei sich Filter wie Viresolve 70, Planova 15 N und Pall Ultipor DV20 bewährt haben. Der Blutgerinnungsfaktor IX hat jedoch ein kleines Molekulargewicht von 56 kDa und wird deshalb nicht durch die für die Nanofiltration eingesetzten Membranen zurückgehalten. Große Proteine wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und Faktor VIII sind jedoch bisher als zu groß angesehen worden, um sie durch Filtration durch einen Nanofilter mit einer Knotengröße mit 15 bis 35 nm von Viren zu befreien.

[0003] Fibrinogen ist ein 340 kDa hexamerer ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) Glykoprotein. Die Kristallstruktur von natürlichem Hühner-Fibrinogen zeigt eine Länge von 46 nm. Elektronenmikroskopische Messungen haben gezeigt, dass Fibrinogen eine Dreiknotenstruktur mit einer Länge von 47,5 nm und einer Knotengröße von 6,5 nm aufweisen. Außerdem führt die Hydratation zur Vergrößerung des Fibrinogenmoleküls. Deshalb konnten bisher nur Filtrationsverfahren für Fibrinogen bei einer Filterporengröße von 35 nm beschrieben werden. Damit ist der Nachteil verbunden, dass bei einer Porengröße von 35 nm kleinere, nicht umhüllte Viren wie der Hepatitis-A-Virus und der Parvovirus nicht entfernt werden können. Obwohl Nanofilter mit einer Porengröße von 20 und weniger nm zur Verfügung stehen, mit denen auch Hepatitis-A-Viren oder Parvoviren entfernt werden könnten, kann deshalb von diesen Filtern bei der Reinigung von Fibrinogen bisher kein Gebrauch gemacht werden, da dieses Molekül für diese Porengröße als zu voluminös anzusehen ist (Roberts, P., Vox Sang, 1995; 69:82-83).

[0004] Da jedoch die Nanofiltration eine besonders schonende Methode zum Entfernen von Viren aus Proteinlösungen ist und dabei die biologische Aktivität der Proteine voll erhalten bleibt, stellte sich die Aufgabe, ein Verfahren zur Virusentfernung aus Proteinlösungen durch Nanofiltration zu entwickeln, mit dem auch großvolumige Proteinmoleküle einer Nanofiltration zugänglich gemacht werden können.

[0005] Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren, bei dem der Proteinlösung vor der Nanofiltration zur Verminderung oder Verhinderung der Aggregation und

der Ausbildung einer Hydrathülle der Proteinmoleküle eine chaotrope Substanz aus der Gruppe bestehend aus Arginin, Guanidin, Citrullin, Harnstoff oder ihren Derivaten oder eine Verbindung aus der Gruppe der Polyethoxy-Sorbitanester zugesetzt wird und anschließend die Lösung durch einen Filter mit einer Porengröße zwischen 15 bis 25 nm filtriert wird.

[0006] Besonders geeignet ist das Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Fibrinogenlösung oder aus einer Lösung eines Blutgerinnungsfaktors, zum Beispiel des Faktors VIII.

[0007] Das Verfahren kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wodurch eine thermische Belastung und der damit verbundene biologische Aktivitätsverlust der Proteinmoleküle vermieden wird. Proteine mit Molekulargewichten von 200 bis 340 kDa können so bei einer Porengröße von 15 bis 25 nm von Viren befreit werden. Insbesondere Mitglieder der Parvovirusfamilie, die eine globuläre Partikelgröße von 18 bis 26 nm besitzen und Hepatitis-A-Viren mit einer stabförmigen Struktur von 6 bis 17 nm Durchmesser und etwa 48 nm Länge können so entfernt werden.

[0008] Das erfindungsgemäße Filtrationsverfahren lässt sich darüber hinaus mit sehr guten Erfolg mit einem konventionellen Pasteurisierungsverfahren kombinieren, wodurch die Abreicherung von Viren noch weiter erhöht wird.

[0009] Die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Nanofilter sind im Handel erhältlich und können z.B. unter den Bezeichnungen DV-15, DV-20 u.a. erworben werden.

[0010] In der als Anlage beigefügten Fig. 1 wird gezeigt, wie die Menge der durch Nanofiltration gewonnenen, virenfreien Fibrinogenlösung von der Porengröße des Filters einerseits und vom Zusatz von Argininmonohydrochlorid andererseits abhängt. Es ist zu erkennen, dass bei Zusatz von Argininmonohydrochlorid auch schon bei einer Porengröße von 15 nm befriedigende Mengen von Fibrinogen-Filtrat gewonnen werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Proteinlösung durch Nanofiltration, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Proteinlösung vor der Nanofiltration zur Verminderung oder Verhinderung der Aggregation der Proteinmoleküle mit einer chaotropen Substanz aus der Gruppe bestehend aus Arginin, Guanidin, Citrullin, Harnstoff oder ihren Derivaten oder mit einer Verbindung aus der Gruppe der Polyethoxysorbitanester versetzt und anschließend die Lösung durch einen Filter mit einer Porengröße zwischen 15 bis 25 nm gibt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** man eine Virusabtrennung in einer

Fibrinogenlösung oder in einer Lösung eines Blutgerinnungsfaktors durchführt.

3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Nanofiltration bei Zimmertemperatur durchführt. 5
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Proteinlösung zusätzlich zur Nanofiltration einer Pasteurisierung unterwirft. 10

15

20

25

30

35

40

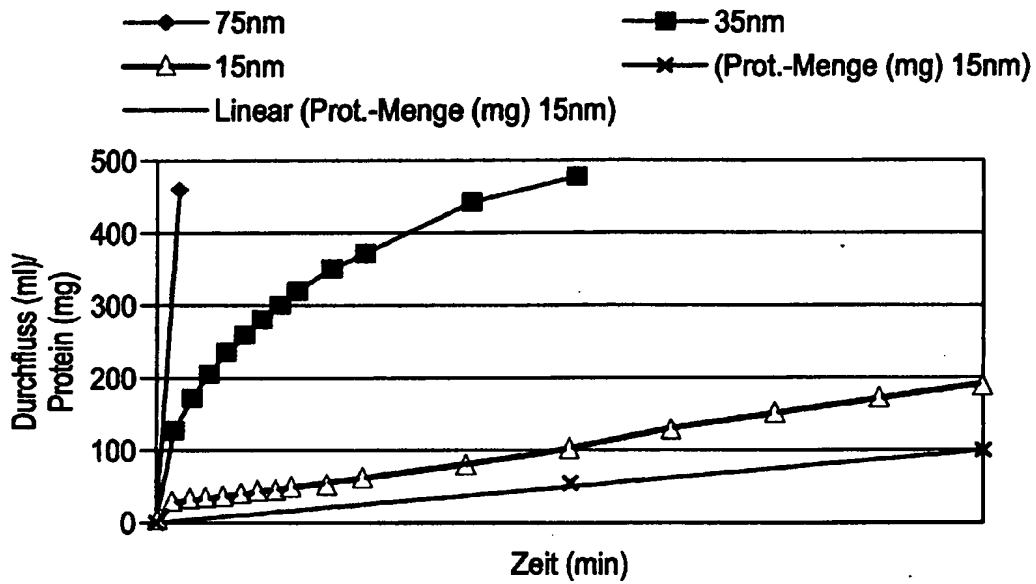
45

50

55

Nanofiltration von Fibrinogen

ohne Arg Zusatz



Nanofiltration von Fibrinogen

mit Arg Zusatz

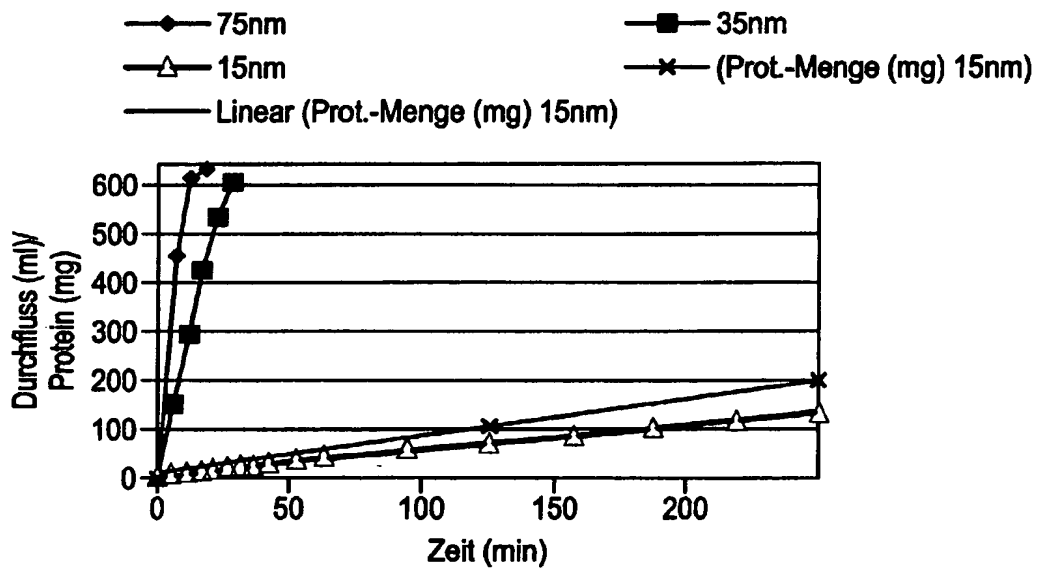


Fig. 1



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 03 00 3632

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	EP 1 136 084 A (AVENTIS BEHRING GMBH) 26. September 2001 (2001-09-26) * Ansprüche; Beispiele 2,4 *	1-4	A61L2/00
X	WO 99 64441 A (TOELOE HANNELE ;PARKKINEN JAAKKO (FI); SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIP) 16. Dezember 1999 (1999-12-16) * Seite 3, Zeile 19 - Seite 8, Zeile 25; Ansprüche; Beispiele *	1-4	
X	WO 99 19343 A (MILLIPORE CORP ;ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC (US)) 22. April 1999 (1999-04-22) * Seite 8, Zeile 19 - Seite 11, Zeile 20; Ansprüche *	1-4	
Y	WO 99 23111 A (HAEMACURE CORP) 14. Mai 1999 (1999-05-14) * Ansprüche; Abbildung 1; Beispiele *	1-4	
Y	EP 1 153 608 A (AVENTIS BEHRING GMBH) 14. November 2001 (2001-11-14) * Ansprüche *	1-4	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Y	WO 00 29041 A (CENTEON PHARMA GMBH ;GRONSKI PETER (DE); METZNER HUBERT (DE)) 25. Mai 2000 (2000-05-25) * Seite 2, Zeile 28 - Seite 8, Zeile 32 *	1-4	A61L C07K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort MÜNCHEN		Abschlußdatum der Recherche 30. Juli 2003	Prüfer Sommer, B
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtsofortliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.02 (P04003)



Europäisches
Patentamt

Nummer der Anmeldung
EP 03 00 3632

GEBÜHRENPFLICHTIGE PATENTANSPRÜCHE

Die vorliegende europäische Patentanmeldung enthielt bei ihrer Einreichung mehr als zehn Patentansprüche.

- ☐ Nur ein Teil der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn sowie für jene Patentansprüche erstellt, für die Anspruchsgebühren entrichtet wurden, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der Anspruchsgebühren wurde innerhalb der vorgeschriebenen Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die ersten zehn Patentansprüche erstellt.

MANGELNDE EINHEITLICHKEIT DER ERFINDUNG

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

Siehe Ergänzungsblatt B

- ☐ Alle weiteren Recherchengebühren wurden innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.
- ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Recherchenabteilung nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
- ☐ Nur ein Teil der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf Erfindungen beziehen, für die Recherchengebühren entrichtet worden sind, nämlich Patentansprüche:
- ☐ Keine der weiteren Recherchengebühren wurde innerhalb der gesetzten Frist entrichtet. Der vorliegende europäische Recherchenbericht wurde für die Teile der Anmeldung erstellt, die sich auf die zuerst in den Patentansprüchen erwähnte Erfindung beziehen, nämlich Patentansprüche:



Europäisches
Patentamt

**MANGELNDE EINHEITLICHKEIT
DER ERFINDUNG
ERGÄNZUNGSBLATT B**

Nummer der Anmeldung

EP 03 00 3632

Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung nicht den Anforderungen an die Einheitlichkeit der Erfindung und enthält mehrere Erfindungen oder Gruppen von Erfindungen, nämlich:

1. Ansprüche: 1-4 (teilweise)

Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Proteinlösung durch Nanofiltration, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proteinlösung vor der Nanofiltration zur Verminderung oder Verhinderung der Aggregation der Proteinmoleküle mit einer chaotropen Substanz aus der Gruppe bestehend aus Arginin, Guanidin, Citrullin, Harnstoff oder ihren Derivaten versetzt und anschliessend die Lösung durch einen Filter mit einer Porengrösse zwischen 15 bis 25 nm gibt sowie damit zusammenhängende Gegenstände;

2. Ansprüche: 1-4 (teilweise)

Verfahren zur Abtrennung von Viren aus einer Proteinlösung durch Nanofiltration, dadurch gekennzeichnet, dass man die Proteinlösung vor der Nanofiltration zur Verminderung oder Verhinderung der Aggregation der Proteinmoleküle mit einer Verbindung aus der Gruppe der Polyethoxysorbitanester versetzt und anschliessend die Lösung durch einen Filter mit einer Porengrösse zwischen 15 bis 25 nm gibt sowie damit zusammenhängende Gegenstände;

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 03 00 3632

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

30-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1136084	A	26-09-2001	DE 10012732 A1	20-09-2001
			AU 2804201 A	20-09-2001
			CA 2340863 A1	18-09-2001
			EP 1136084 A1	26-09-2001
			JP 2001261574 A	26-09-2001
			US 2001033837 A1	25-10-2001

WO 9964441	A	16-12-1999	FI 981337 A	11-12-1999
			AU 4783499 A	30-12-1999
			EP 1086120 A1	28-03-2001
			WO 9964441 A1	16-12-1999

WO 9919343	A	22-04-1999	US 6096872 A	01-08-2000
			AU 744845 B2	07-03-2002
			AU 1081799 A	03-05-1999
			CA 2306181 A1	22-04-1999
			CN 1279688 T	10-01-2001
			EP 1030862 A1	30-08-2000
			JP 2002500164 T	08-01-2002
			NO 20001949 A	14-06-2000
			WO 9919343 A1	22-04-1999

WO 9923111	A	14-05-1999	US 5981254 A	09-11-1999
			AU 759145 B2	03-04-2003
			AU 9731698 A	24-05-1999
			CA 2307380 A1	14-05-1999
			WO 9923111 A1	14-05-1999
			EP 1027371 A1	16-08-2000
			JP 2001521941 T	13-11-2001
			NO 20002293 A	30-06-2000
			NZ 504246 A	27-09-2002
			PL 340300 A1	29-01-2001

EP 1153608	A	14-11-2001	DE 10022092 A1	15-11-2001
			AU 4373901 A	15-11-2001
			CA 2346616 A1	08-11-2001
			EP 1153608 A1	14-11-2001
			JP 2002275090 A	25-09-2002
			US 2001051154 A1	13-12-2001

WO 0029041	A	25-05-2000	AU 1383400 A	05-06-2000
			CA 2351544 A1	25-05-2000
			WO 0029041 A1	25-05-2000
			EP 1131110 A1	12-09-2001
			JP 2002529202 T	10-09-2002
			US 2003133928 A1	17-07-2003

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 03 00 3632

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Daten des Europäischen Patentamts am
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

30-07-2003

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0029041 A	US	6447774 B1	10-09-2002

EPO FORM P4481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82